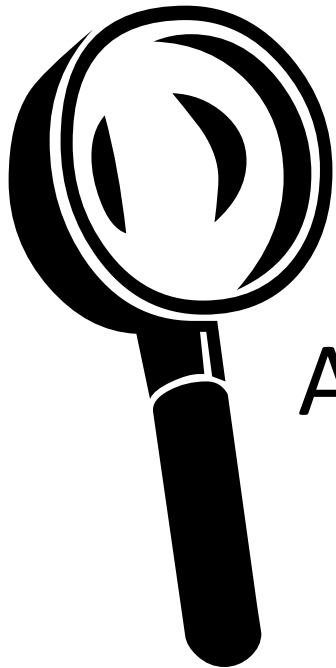


Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl osmý:

Acidorezistentní a vláknití pachatelé
a pachatelé stočení do spirály

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt:
zahradnicek@fnusa.cz). K praktickému cvičení pro Bi7170c

Přehled jednotlivých částí

Klinická charakteristika acidorezistentních bakterií

Specifické vlastnosti acidorezistentních bakterií

Diagnostika acidorezistentních bakterií

Klinická charakteristika spirálních bakterií

Mikrobiologická charakteristika a dg. spirochet

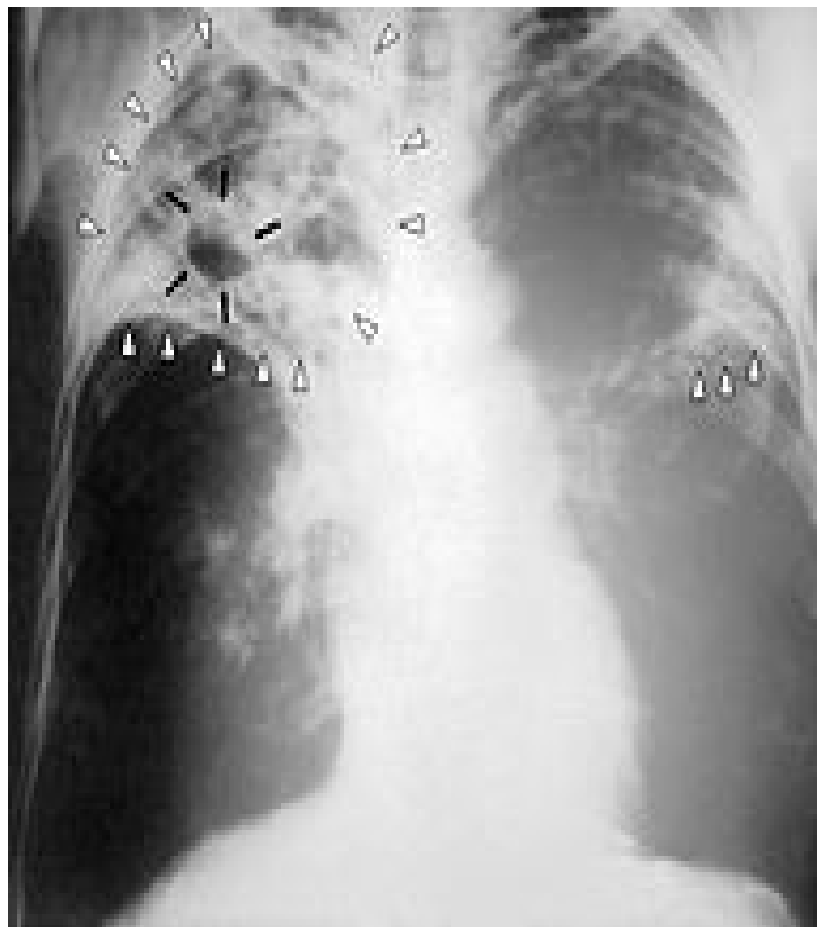
Bonus 1: Rickettsie a chlamydie

Bonus 2: Rozšířené povídání o mikroskopii

Klinická
charakteristika
acidorezistentních
bakterií

Příběh první

- Honza již několik let věděl, že je **HIV pozitivní**. Dobře věděl, že je mnohem zranitelnější než ostatní lidé, že ho každá infekce dostihne rychleji než jiné
- Přesto ho zaskočilo, že **v poslední době začal kašlat**. Jeho ošetřující lékaři zkoušeli různé možnosti, až nakonec na základě rentgenu, PCR vyšetření a kultivačního vyšetření dospěli k názoru, že se jedná o **miliární (zrnkovitou) formu tuberkulózy**.



An anteroposterior X-ray of a patient diagnosed with advanced bilateral pulmonary tuberculosis. This AP X-ray of the chest reveals the presence of bilateral pulmonary infiltrate (white triangles), and „caving formation“ (black arrows) present in the right apical region. The diagnosis is far-advanced tuberculosis.

Zdroj:

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tuberculosis-x-ray-1.jpg>

Viníkem zde bylo...

- *Mycobacterium tuberculosis*, i když TBC může způsobovat například i *Mycobacterium bovis*.
- Zajímavostí tohoto mikroba je záliba v životě **uvnitř buněk**. S tím také souvisí skutečnost, že na mykobakteria se **špatně tvoří protilátková odpověď** (takže se nedá prokazovat antigen ani protilátky) a že hlavní slovo má **buněčná imunita** – i při vakcinaci.
- Jelikož při HIV infekci je právě buněčná imunita postižena, je TBC jednou z **oportunních infekcí**.

Skutečný příběh

19. září 2007 15:17

Plzeňští kriminalisté našli muže, který má zřejmě TBC. Lékaři příznaky nemoci identifikovali u sedmačtyřicetiletého Marcela Pfeifera v pondělí, pacient jim slíbil, že přijde druhý den, ale už se neobjevil. Proto po něm bylo vyhlášeno pátrání.

"Nemocný muž se dnes pohyboval po Slovanské třídě, v blízkosti křižovatky s Liliovou ulicí," uvedl mluvčí plzeňské policie Jaroslav Ibehej.

Kriminalistům po zveřejnění pátrání volala řada lidí. Poslední z nich policisty skutečně navedl na místo, kde Pfeifer byl. Nyní ho čeká převoz do zdravotnického zařízení v Janově na Rokycansku.

Tuberkulóza je nebezpečné nakažlivé onemocnění. Léčba pomalu se rozvíjející nemoci je velmi zdlouhavá. Po celou dobu je třeba být pod dohledem odborníků.

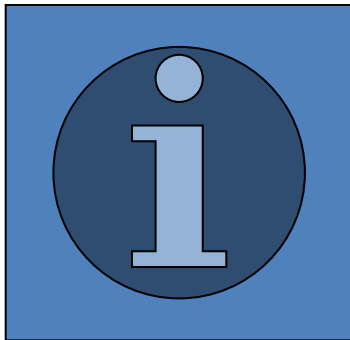
Kvůli zamezení šíření nákazy musí zdravotníci vyhledávat také lidi, kteří byli v kontaktu s tuberkulózním pacientem.

Tuberkulóza

- Při prvotním styku s infekcí dojde ke vzniku tzv. **primárního komplexu**. Je to ložisko (obvykle v plicích) a k němu přiléhající mízní uzlina.
- Při další infekci vzniká tzv. **postprimární TBC**, která je horší. Zpravidla vznikne granulomatózní útvar, který později podléhá kaseifikaci („zesýrovatění“) a pak už se dále nezvětšuje. Paradoxně za většinu škod v organismu může reakce hostitelského organismu (pozdní přecitlivělost – vlastně druh alergie)
- Po letech se může ložisko znovu **aktivizovat**, zejména ve stáří, při podlomení imunity, nebo i při abúzu alkoholu. Takový člověk může být velmi nebezpečný pro své okolí.

Intracelulární mikroby

- *Mycobacterium* je sice často přítomno uvnitř buněk, není však obligátně intracelulárním patogenem. Tím jsou naopak viry, a také chlamydie a rickettsie. Přečtěte si o nich v bonusovém materiálu!



Další zvláštnosti mykobakterií

- Jejich buněčná stěna je vysoce hydrofobní, jsou v ní tzv. mykolové kyseliny. Téměř se nebarví podle Grama, jsou nutná speciální barvení.
- Rostou pomalu, mají dlouhou generační dobu, proto jsou pro kultivaci nutné speciální půdy.
- Jsou velmi odolná k desinfekčním prostředkům. Nelze použít prostředky spektra „A“, proti běžným bakteriím, je nutné „T“ (proti TBC), případně „M“ (proti atypickým mykobakteriím).
- Jsou též odolná k antimikrobiálním látkám.

Příběh druhý

- Pan Hassan žil v **pouštní části Súdánu**, zmítané neustálými válkami a nepokoji.
- V poslední době se od něj začali odvracet i ti přátelé, kteří ještě neuprchli ani nebyli povražděni. **Znetvoření obličeje** pana Hassan bylo neklamnou známkou, že pan Hassan trpí onemocněním, které se **v těchto zeměpisných šířkách ještě stále vyskytuje až příliš často**.
- Naštěstí se pan Hassan setkal s pracovníky jedné **nevládní organizace**, kterým rovněž byla diagnóza jasná. Pomocí **dapsonu** se podařilo panu Hassan pomoci.

Viníkem je

- *Mycobacterium leprae*, mikrob ještě zvláštější než tuberkulózní mykobakterium
- Původce nákazy objevil v roce 1873 norský lékař Gerhard Henrik Armauer Hansen, proto bývá *Mycobacterium leprae* také označován jako Hansenův bacil.
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší. In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok (pro praxi nepoužitelné)

Mycobacterium leprae

- Nemoc často probíhá bez příznaků a není příliš nakažlivá. Výjimkou je kožní forma s vředy, která nakažlivá je. Občas se vyvine destruktivní forma, která napadá Schwannovy buňky a makrofágy v periferních nervech. Znetvořuje obličej i další části těla.
- Základní léčba lepry není drahá, bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká
- Proto se problémem lepry zabývá řada nadací, nevládních a charitativních organizací a podobně.

Lepra

- Dlouhá inkubační doba – 2, 3, 7 ... let
- Tuberkuloidní lepra
 - Na kůži necitlivé depigmentované skvrny, zduřelé periferní nervy
 - Výrazná celulární imunita
 - Spontánní zhojení
- Lepromatózní lepra
 - Nedostatečná celulární imunita
 - Dochází ke splývání a zduření kožních lézí, obočí vypadává, propadá se nos, slepota, ztráta prstů

Příběh třetí

- Pan Piraña byl zuřivým akvaristou. Poslední měsíc měl problém: musel do akvárií nořit jen levou rukou, protože na pravé měl vřed.
- Po vyšetřování byl jeho případ uzavřen jako tzv. **fish tank granuloma**, běžný u akvaristů. Podobná nemoc plavců se nazývá **swimming pool granuloma**.
- Původci jsou...

Atypická mykobakteria

- Kromě *M. tuberculosis* a *M. leprae* existuje i spousta dalších mykobakterií. Některá, např. *Mycobacterium marinum*, patří mezi tzv. atypická mykobakteria, která občas způsobují infekce ran a jiné problémy.
- Některá jiná mykobakteria jsou nepatogenní a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis*.

Příběh čtvrtý

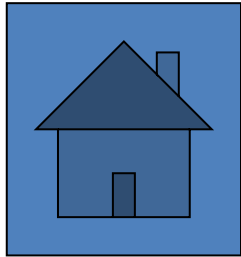
- Paní Píšťelková si už delší dobu hmatala pod kůží krku **drobné útvary**.
- Nedávno se stalo, že jeden z těchto útvarů se **otevřel na povrch** a v ústí se objevil velmi hustý, žlutý páchnoucí hnis. To už paní Píšťelkovou donutilo zajít k lékaři.
- Lékaři poslali **hnis na mikrobiologické vyšetření**. Vyšetření **trvalo dlouho**, ale nakonec se ukázalo, že...

...jde o aktinomykózu

- tedy že viníkem je *Actinomyces* sp.
- Aktinomycety jsou grampozitivní vláknité bakterie, příbuzné mykobakteriím, ale na rozdíl od nich zpravidla nejsou acidorezistentní. Vlákna se větví v ostrých úhlech
- Aktinomycety se běžně vyskytují v ústní dutině zdravých osob. Odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku. Jsou mikroaerofilní, ale jejich potřeba kyslíku je často tak malá, že se běžně považují za anaerobní bakterie
- Podobné aktinomycetám jsou nokardie, které jsou naopak striktně aerobní a jsou v různé míře acidorezistentní. Jinak však mají hodně podobné vlastnosti, jsou také větvené
- Další příbuzný rod je rod *Streptomyces* (→ streptomycin)

Poznámka k taxonomii

- Všechny bakterie z tohoto tématu patří do stejného řádu – *Actinomycetales*.
- Na druhou stranu tento řád také obsahuje některé bakterie zmíněné v tématech P01 (*Micrococcus, Kocuria*), P03 (*Corynebacterium, Arcanobacterium, Dermatophilus, Rhodococcus, Turicella*) a P07 (*Propionibacterium*)
- Další důležité bakterie v tomto řádu jsou také:
 - ***Bifidobacterium*** – důležitá součást střevní mikroflóry; je anaerobní
 - ***Gardnerella*** – gram-variabilní pleomorfní tyčinky, účastníci se na poševní mikroflóře, ale také důležité při bakteriální vaginóze (více v tématu P13)
 - ***Mobilluncus*** – barví se gramnegativně, ale jeho buněčná stěna je grampozitivního typu; také se podílí na bakteriální vaginóze

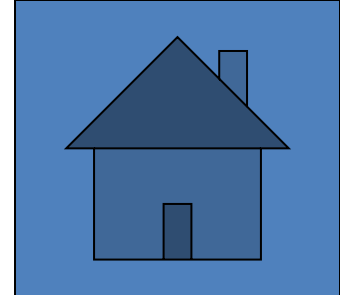


Specifické vlastnosti acidorezistentních bakterií

Acidorezistence a alkalirezistence

- Aby mohly na něco působit kyseliny či alkálie, musí to „něco“ být hydrofilní, tedy komunikovat s vodným prostředím. Pro mykobakteria však tohle neplatí.
- Nejsme tedy schopni je kyselinami či alkáliemi ničit.
- Nejsme také schopni je kyselinami odbarvovat, pokud tedy se je nějakým zázrakem podařilo obarvit.
- Totiž: většina barviv je také hydrofilních, a tudíž **se mykobakteria i špatně barví**, zpravidla je nutno barvit je za horka, aby se vůbec obarvila.
- **Nokardie a aktinomycety** lze, na rozdíl od mykobakterií, barvit Gramem, protože acidorezistentní jsou jen částečně nebo vůbec. Musíme ale počítat s tím, že se často barví poměrně špatně.

Co z toho vyplývá pro klinika?



- Pokud klinik pošle vzorek (sputum, moč, hnis či cokoli jiného) „na bakteriologickou kultivaci“, nemůže očekávat, že vyšetření odhalí případnou přítomnost mykobakterií.
- Chce-li klinik zjistit, zda má pacient TBC, musí poslat vzorek zvlášť a na průvodce výrazně označit, že má být vyšetřen kultivačně či pomocí PCR na tuberkulózu. V tom případě laboratoř provede příslušné procedury.
- Podobně je potřeba na žádanku označit podezření na aktinomykózu nebo nokardiózu.

Diagnostika acidorezistentních bakterií

Jak pátrat po mykobakteriích

- **Mikroskopie:** Používá se Ziehl-Neelsenovo a fluorescenční barvení
- **Kultivace:** Používá se speciálních půd, přičemž vlastní kultivaci předchází **moření, obvykle louhem**. Cílem **moření je usmrtit ostatní bakterie**, které by při svém rychlém růstu byly kultivačně úspěšnější. Alkalirezistentní mykobakteria moření snadno přežijí.
- **Automatická kultivace:** Používá se různých typů kultivačních automatů – mohou detekovat kultivační pozitivitu mnohem dříve než klasická kultivace
- **Biochemické rozlišení:** je možné, je však vyhrazeno specializovaným laboratořím
- **Pokus na zvířeti:** občas se používá morče
- **PCR diagnostika:** stále důležitější

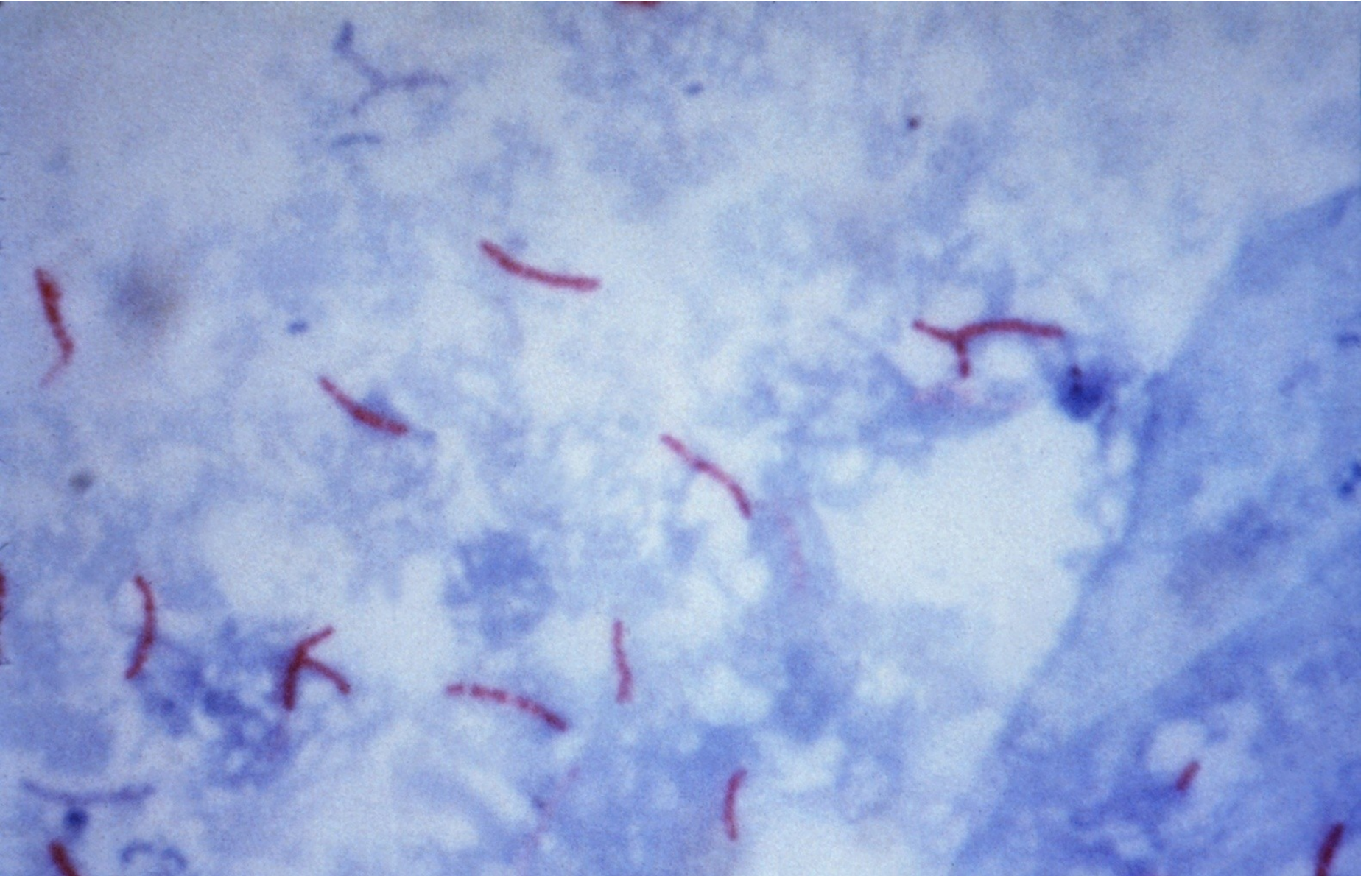
Mycobacterium tuberculosis



Postup barvení dle Ziehl-Neelsena

- **V prvním kroku** barvíme karbolfuchsinem (Gabbetem) za horka až do výstupu par. Bez zahřívání by mykobakteria nešlo obarvit, leda při použití koncentrovanějšího karbolfuchsinu (modifikace podle Kinyouna).
- **V druhém kroku** odbarvujeme cca 15 s „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou, poté opláchneme vodou
- **Ve třetím kroku** dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme cca 30 s **malachitovou zelení** nebo **metylénovou modří**. Opět opláchneme, osušíme a pozorujeme imerzí.
- **Výsledkem** jsou červené acidorezistentní tyčinky na **modrém** nebo **zeleném** pozadí

Ziehl-Neelsenovo barvení



Použití pro střevní kokcidie

- Zajímavostí je, že Ziehl-Neelsenovo barvení lze použít i pro skupinu parazitů, tzv. střevní kokcidie (kryptosporidia a cyklospory).

Kultivace mykobakterií

- Před kultivací musí být provedeno moření.
- Používáme tekutou půdu Šulovu či Baničovu a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu. Vaječné půdy jsou tuhé vzhledem ke koagulaci vaječného bílku – neobsahují agar.
- I pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou. Není to jen kvůli ohrožení personálu, ale především kvůli vyschnutí půdy.
- Výsledky se odečítají po 1 (kontrola kontaminace) 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace. (Pozitivní výsledky se obvykle nacházejí po šesti týdnech).

K tekuté Šulově půdě

- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna („modrej bordel“, jak to trefně označila studentka J. H. 😊)

(Poznámka: Bordel případně může být i bílý)



Testy antituberkulotické citlivosti (nikoli antibiotické!)

- **Antituberkulotika** jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik.
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř: rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně.
- Nelze používat difúzní diskové testy.
- Antituberkulotika proto přidáváme přímo do (pevné) kultivační půdy. Přidáme kontrolu růstu.
- **Mykobakterium roste → je rezistentní**
- **Mykobakterium neroste → je citlivé**

Přehled běžně užívaných antituberkulotik

Antituberkulotikum	Zkratka
Isoniazid	H, INH
Ethambutol	E
Rifampicin	R
Pyrazinamid	Z
Streptomycin	S, STM

Tuberkulózní játra
pokusného morčete

Věnovala dr. Jana Svobodová a dr. Lev
Mezenský

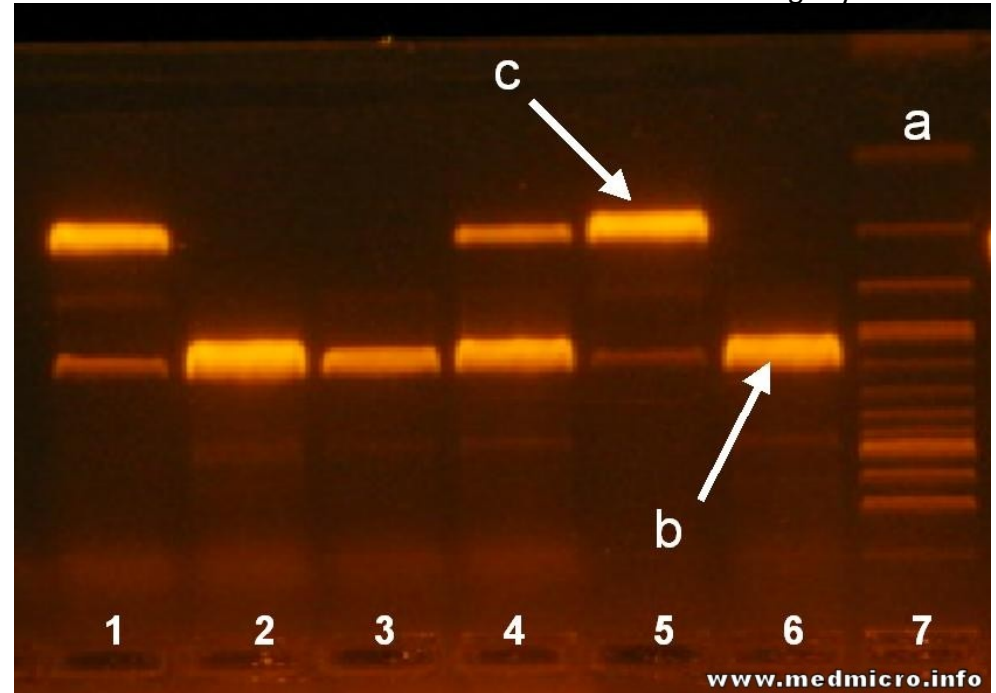


PCR v diagnostice TBC

Mikrobiologický ústav

- 1, 2, 3, 4 = pacienti
- 5 = pozitivní kontrola
- 6 = negativní kontrola
- 7 = ladder (žebříček)
- horní řádek = proužek vzorku (c)
- dolní = IC (b)

PCR je metodou, která se v diagnostice TBC používá více než v diagnostice jiných bakterií. Je to proto, že diagnostiku výrazně urychluje, přičemž u TBC příliš nehrozí riziko kontaminace z prostředí.



Nepřímý průkaz TBC

- Nejdůležitějším typem imunity u TBC je buněčná imunita. Tvorba **protilátek** se vyskytuje, ale měřitelná množství jsou přítomna jen u části případů.
- Pozitivní nález protilátek lze považovat za známku infekce, zato však negativní nález má minimální informační hodnotu.
- **Buněčnou imunitu** lze testovat:
 - **kožním (tuberkulinovým) testem**, zvláště po vakcinaci
 - **testem uvolňování IFN-gama** (reakce pacientových buněk na antigenní výzvu)

Kožní testy (Mantoux)

- Používají se pro **ověření účinnosti očkování**, ale také k průkazu případné latentní infekce (i když spíše jsou už nahrazeny testem produkce IFN gama).
- Na testy je potřeba **celý pacient**, nejde tedy o laboratorní test. Test provádějí dermatovenerologická či jiná specializovaná pracoviště. V poslední době se opouští a nahrazují následujícím typem testů
- **Pozitivní** jsou tyto testy v případě, že je aktivována buněčná imunita; jde vlastně o jistý typ opožděné alergie.

Test uvolnění interferonu gama (Quantiferon[©] TB-GOLD)

- Moderní možností k ověření buněčné imunity je vyšetření **indukovaného uvolňování interferonu gama**, v praxi se používá prakticky výhradně komerčně dostupný test Quantiferon TB-GOLD.
- Bylo prokázáno, že při tuberkulóze, a to i latentní, dochází k tomu, že **tuberkulózní antigeny aktivují T-lymfocyty** a ty tvoří velká množství interferonu gama.
- Podobně lze tyto T-lymfocyty aktivovat nespecificky např. takzvaným **mitogenem**, ten se proto používá jako pozitivní kontrola.

Quantiferon – tři zkumavky

- Odebírá se nesrážlivá (heparinizovaná) krev do tří zkumavek (potřebujeme lymfocyty!)
- První zkumavka obsahuje **mitogen (MIT)** – zde by mělo za normálních okolností **vždy** dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama.
- Druhá zkumavka obsahuje **antigeny TBC (TB)** – zde by mělo dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama **pouze u infekce TBC.**
- Třetí zkumavka **neobsahuje nic (NIL)** – zde by za normálních okolností **nemělo docházet** ke stimulaci tvorby interferonu gama.

Quantiferon – hodnocení

- Koncentrace interferonu se měří metodou ELISA.
- Za **pozitivní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci antigenem mykobakteria, avšak ve zkumavce neobsahující nic nedochází k tvorbě interferonu.
- Za **negativní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci mitogenem, ale nereagují na stimulaci antigenem mykobakteria.
- **Neurčitý výsledek** se objeví (1) v případě, že T-lymfocyty nejsou aktivovány ani mitogenem, nebo naopak (2) se tvorba interferonu objeví i ve zkumavce, kde nic nebylo.

Příklad hodnocení*

*může se lišit u jednotlivých typů testu

NIL [IU/ml]	TB minus NIL [IU/ml]	MIT minus NIL [IU/ml]	Výsledné hodnocení testu	Přítomnost infekce <i>M. tuberculosis</i>
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativní	Nepravděpodobná
	≥ 0,35 a < 25% hodnoty NIL	≥ 0,5		
	≥ 0,35 a ≥ 25% hodnoty NIL	libovolná hodnota	Pozitivní	Pravděpodobná
	< 0,35	< 0,5	Neurčitý	Nelze určit
≥ 0,35 a < 25% hodnoty NIL		< 0,5		
> 8,0	libovolná hodnota	libovolná hodnota		

Quantiferon – zásady odběru

- Uchovávat prázdné odběrové zkumavky důsledně při **4–25°C**.
- Odebrat **správný objem krve** (3 x 1 ml).
- Po odběru opakovaným obrácením zkumavky **dostat do kontaktu vzorek krve s lyofilizovanými antigeny** přítomnými na vnitřním povrchu zkumavky.
- Zkumavky **po odběru uchovávat při teplotě 17–27 °C**.
- Vzorek dopravit do laboratoře k dalšímu zpracování co **nejdříve, nejpozději 16 hodin po odběru**.

Mikroskopie nokardií a aktinomycet

- Částečně rezistentní aktinomycety a nokardie se dle Grama barví, i když špatně. Jsou také pleomorfní (různotvaré).
- Obě jsou typické **větvenými vlákny**, která se barví **grampozitivně**, ačkoli některé části vláken se mohou jevit gramnegativně nebo mohou zůstat zcela nezbarvené.
- Někdy se v mikroskopii také mohou objevit krátké (kokoidní) formy.

Kultivace nokardií a aktinomycet

- I když jsou oba rody v mnohém podobné, jedno se liší: nokardie jsou striktně aerobní, aktinomycety rostou za anaerobních podmínek
- Popište kolonie na KA a krevním VL agaru. Všimněte si, které bakterie rostou za aerobních podmínek a které za anaerobních

Citlivost nokardií a aktinomycet na antibiotika

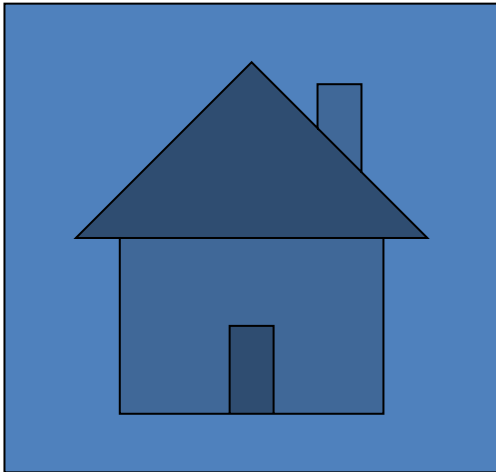
- **Antibiotická citlivost** se na rozdíl od mykobakterií dá u nokardií a aktinomycet stanovit difusním diskovým testem. Musíme ale počítat s tím, že rostou pomalu a špatně.
- U **nokardiózy** se v léčbě používá ko-trimoxazol, případně ampicilin či makrolidy.
- U **aktinomykózy** se používá penicilin, popřípadě doxycyklin a další antibiotika.

Diagnostika lepry leprominovým testem

- **Pásovec devítipásý (anglicky nine banded armadillo)**
- Je nezbytný při výrobě **leprominu**
- Tato látka je používána v **leprominovém testu**, který je obdobou tuberkulinového testu u TBC



Mycobacterium haemophilum, photo O. Z.



Konec

Klinická
charakteristika
spirálních
bakterií

Příběh první

- Růžence Flekové naskákaly po těle růžové skvrny. Vzpomněla si, že by to mohla být... No ano, to by odpovídalo, před několika týdny byla na táboře a několikrát během tábora měla klíště.
- Obvodní lékař ji poslal na dětskou infekční kliniku, kde zkušená infekcionista potvrdila, že opravdu s největší pravděpodobností jde o to, co si myslela Růženka. Pro jistotu ještě odebrala sérum na průkaz protilátek...

Erythema migrans

- Toto je obrázek erythema migrans studenta M. M., který laskavě souhlasil s využitím ve výuce



Viníkem byla

- *Borrelia afzelii*, jedna z borrelií, vyvolávajících Lymeskou nemoc a patřících do druhu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (= „v širším slova smyslu“)
- Tento druh „v širším slova smyslu“ se rozpadá na řadu genomospecies. Nejvýznamnější jsou *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi* sensu stricto
- Zatímco v USA se vyskytuje zejména třetí z oněch borrelií a typické jsou kloubní příznaky, v Evropě jsou častější první dvě borrelie a typická je neuroborrelióza
- Kromě lymeské nemoci vyvolávají borrelie (jiné druhy) návratnou horečku (*B. duttoni*, *B. recurrentis*)

Příběh druhý (vymyšlený, ale základ vychází ze skutečného příběhu)

- Když Lou zjistila, že „perník“ opravdu potřebuje, a čím dál víc, nebylo pro ni daleko k rozhodnutí **vydělat si vlastním tělem**. Konec konců, sex měla vždycky ráda.
- Když si zákazník připlatil, **vyspala se s ním i bez kondomu**, brala přece antikoncepci a samotné jí to víc vyhovovalo...
- Pak se ale zamilovala a **rozhodla se mít dítě**. Vysadila antikoncepci a byla celá šťastná, Helmut bude určitě ten pravý otec...

Příběh druhý – pokračování

- A tak tedy Lou byla těhotná. Zároveň si ale našla vředy na genitáliích a gynekoložka jí odebrala krev na serologické vyšetření. To vyšlo pozitivní. Lou odmítla interrupci ze zdravotních důvodů, jednak se na vše přišlo dost pozdě, jednak touha po dítěti byla silnější.
- Lou byla léčena, bohužel nevhodně zvoleným antibiotikem. Dítě se narodilo nemocné a po dvou týdnech zemřelo na sekundární klebsielovou sepsi

Viníkem zde bylo

- *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, původce syfilis (lues, příjice)
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (gummata, disekce aorty, neurolues, psychické příznaky)
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá jiná treponemata způsobují jiné, jinak přenášené choroby (framboesie – yaws, *T. pertenue*)
- Některá treponemata způsobují orální infekce (*T. denticola* – vztah k paradontitidě), nebo jsou i nepatogenní

Gramatická poznámka

- *Treponema* je slovo řeckého původu. V řečtině je středního rodu a leží vedle slov jako je aróma, magma, sperma, smegma, miasma.
- Ovšem současnost slovo *Treponema* (ale i třeba slovo plasma) rozkolísala, a proto se často používá i ženský rod (ta *Treponema*)
 - Slovenčina urobila všetkým historickým reminiscenciám dôrazný koniec, a preto všetky tieto slová sú v slovenčine ženského rodu.

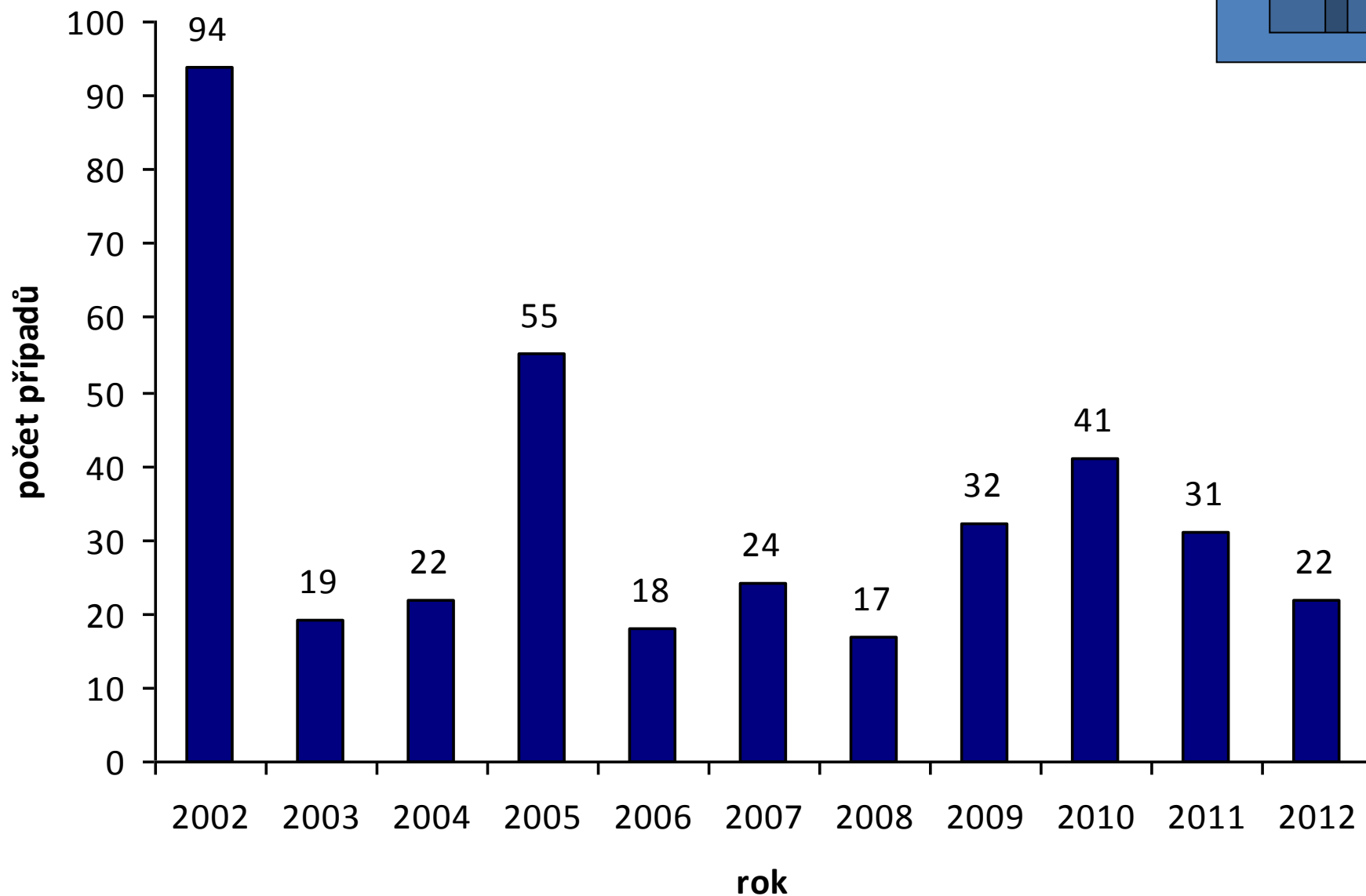
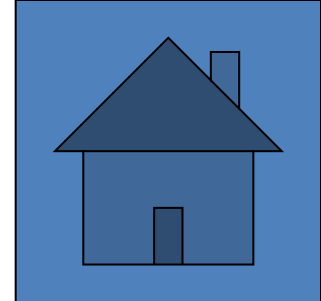
Příběh třetí

- Pan Krysařík byl pracovníkem firmy KVAK (Kocourkovské vodovody a kanalizace, a. s.)
- Jeho denním chlebem byla údržba kanálů. Nebylo kanálu, který by neznal. Znal i zvyky potkanů, měl je docela rád a rozuměl si s nimi.
- Přesto jednou došlo mezi ním a vůdcem tlupy potkanů k jakémusi nedorozumění a pan Krysařík byl kousnut do lýtka
- Netrvalo dlouho, a pan Krysařík ležel se žloutenkou a krvácivými stavy v nemocnici...

Viníkem je...

- *Leptospira interrogans* ser. Icterohemorrhagiae
- Dříve se jednotlivé serovary leptospir považovaly za samostatné druhy, nyní se všechny patogenní považují za součást druhu *Leptospira interrogans* (druhý druh *Leptospira biflexa* je nepatogenní)
- Příznaky mohou být různé, od „chřipkotyfových“ příznaků serovaru Grippotyphosa (blatácká horečka) až po žloutenku a krvácivé stavy (Weilova choroba, jako u pana Krysaříka) serovaru Ictero-hemorrhagiae. *(Tyhle dva serovary se dají celkem logicky zapamatovat, tak když ne jiné, tak sihleďte zapamatovat aspoň je 😊)*

Výskyt leptospirózy v ČR



Mikrobiologická
charakteristika a
diagnostika
spirochet

Spirochety

- Borrelie (ale také treponemata a leptospiry) jsou spirochety, tedy spirální bakterie.
- Jejich buněčná stěna je blízká gramnegativní, ale podle Grama se nebarví už proto, že jsou hrozně tenoučké. Mikroskopovat je lze pouze pomocí zástinu, fázového kontrastu, fluorescence anebo imunofluorescence (což není totéž!)
- Spirochéty se obtížně kultivují
 - (borrelie a leptospiry lze kultivovat ve speciálních médiích)
 - *T. pallidum* nelze v podmínkách *in vitro* kultivovat

Treponemata: jak pátrat přímo

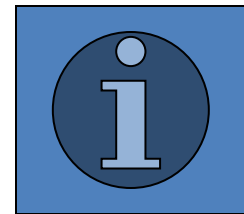
- **Přímý průkaz** se dělá zřídka už proto, že málokdy je co odebrat. Jen pokud má pacient(ka) zrovna tvrdý vřed, lze provést seškrab z něj.
- **Mikroskopie:** Používá se **nativní preparát – zástin**. Zvláštností je, že ač jde o nativní preparát, používá se imerze (treponemata jsou velmi subtilní). Mimo to lze provést **fluorescenční barvení**
- **Kultivace ani biochemická identifikace** se nepoužívají
- **Průkaz antigenu** lze provést přímou IMF
- **Pokus na zvířeti:** Existuje tzv. RIT – Rabbit infectivity test (test infekčnosti na králíkovi)
- **PCR diagnostika** se stává čím dál důležitější. *Zde je výjimka – kromě seškrabu z vředu lze posílat i plnou krev, i když výtěžnost vyšetření je menší.*

Přímý průkaz syfilis – přehled

- RIT – Rabbit infectivity test. Z etických důvodů i z důvodu pracnosti se použití RIT minimalizuje.
- Zástin – hledají se zářící treponemata na tmavém pozadí
- Přímá IMF – další, avšak pracná přímá metoda
- PCR – i z krve

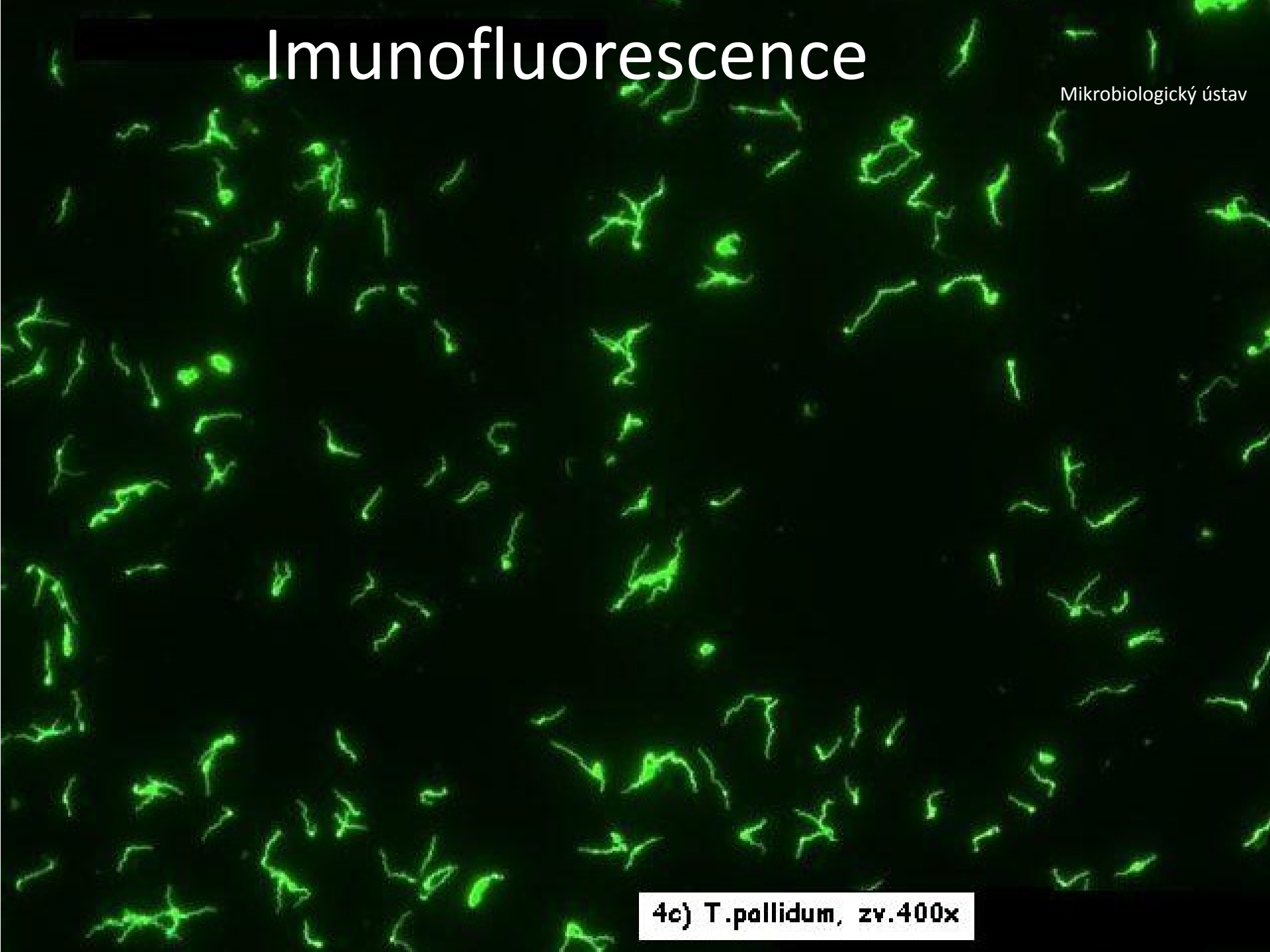
Poznámky k mikroskopii

- Setkáváme se s různými typy mikroskopie:
- **Nativní preparáty** – používá se krycí sklíčko, nefixuje se, nepoužívá se většinou imerzní systém
- **Barvené preparáty** – fixuje se, po obarvení se zpravidla prohlíží imerzí
- **Zástinová mikroskopie** – jde o zvláštní případ nativního preparátu; většinou se však používá imerzní systém
- **Fluorescenční mikroskopie**; pokud je fluorescenčním barvivem značená protilátka či antigen, nejde o fluorescenci jako takovou, ale o imunofluorescenci; ta už je kombinací mikroskopie a serologie
- *Více najdete v bonusovém materiálu*



Imunofluorescence

Mikrobiologický ústav



4c) *T.pallidum*, zv.400x

Treponemata: jak pátrat nepřímo

- Používají se **netreponemové testy**, kde antigenem je zpravidla kardiolipin z hovězích srdcí, a **treponemové testy**, kde antigen je získán opravdu z *Treponema pallidum*
- Diagnostika se skládá ze **screeningu a konfirmace**. Konfirmuje se vše, co ve screeningu vyšlo pozitivní či aspoň hraniční, a dokonce i to, co bylo negativní, je-li důvod.
- **Screeningově** se zpravidla použije jeden netreponemový a jeden treponemový test
- **Konfirmace** se provádí pomocí velmi spolehlivých treponemových testů

Přehled nejdůležitějších nepřímých testů na lues

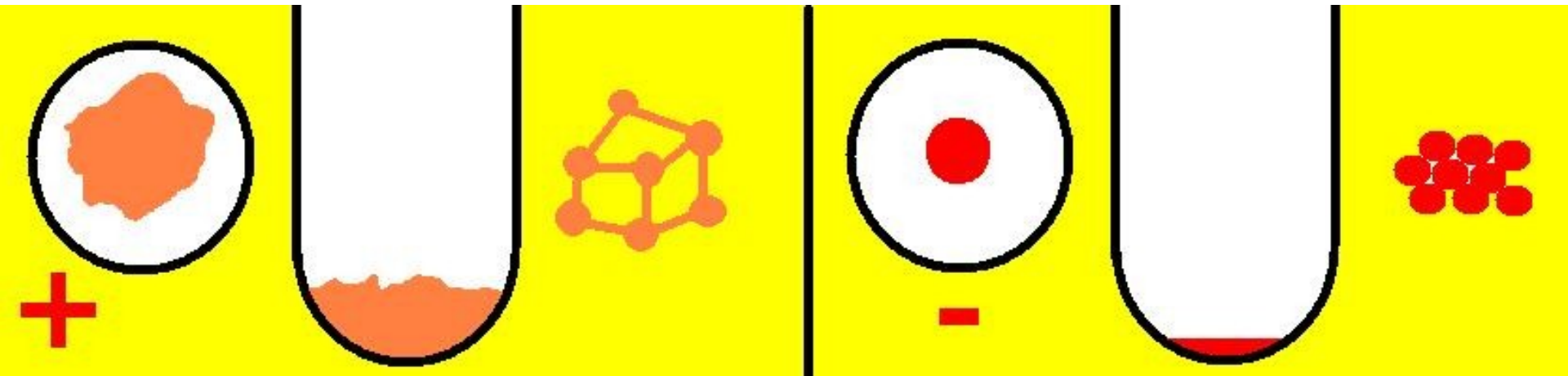
Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test <i>či RPR nebo VDRL test</i>	
	TPHA/TPPA*	Treponemové
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (nepř. imunofluor.)	
	Western Blotting	
<i>Historický, popř. superkonfirmace</i>	<i>TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson</i>	

*TPHA – Tr. pasivní hemaglutinační test
 TPPA – dtto, místo krvinek polycelulóza

RRR a TPHA

- U **RRR** je pozitivní důlek se zákalem (vypadá podobně jako pozitivní kontrola). Panelem je třeba příliš netřepat a nenaklánět.
- **TPHA**: Jde o aglutinaci na nosičích – červených krvinkách. Bramboře podobný útvar je pozitivní, tečka negativní

TPHA – princip



- Pozitivní – vzniká aglutinát, při pohledu shora chuchvalec nepravidelného tvaru
- Negativní – krvinky (u TPPA polycelulózové částice) klesají na dno a vytvářejí denzní pravidelnou kulatou tečku při pohledu shora

Vzhled testu

(Mikrobiologický ústav)

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

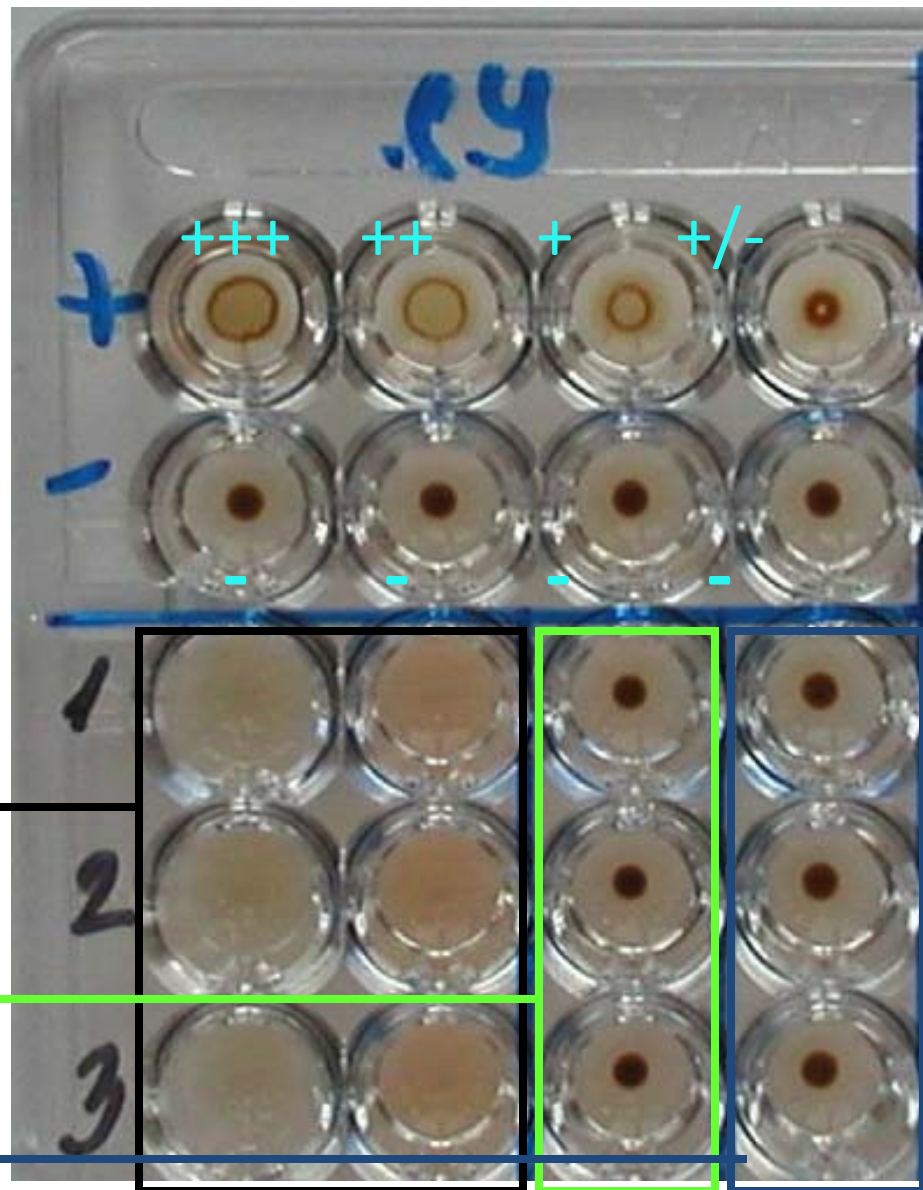
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

Technické důlky

Kontrola

Vlastní reakce

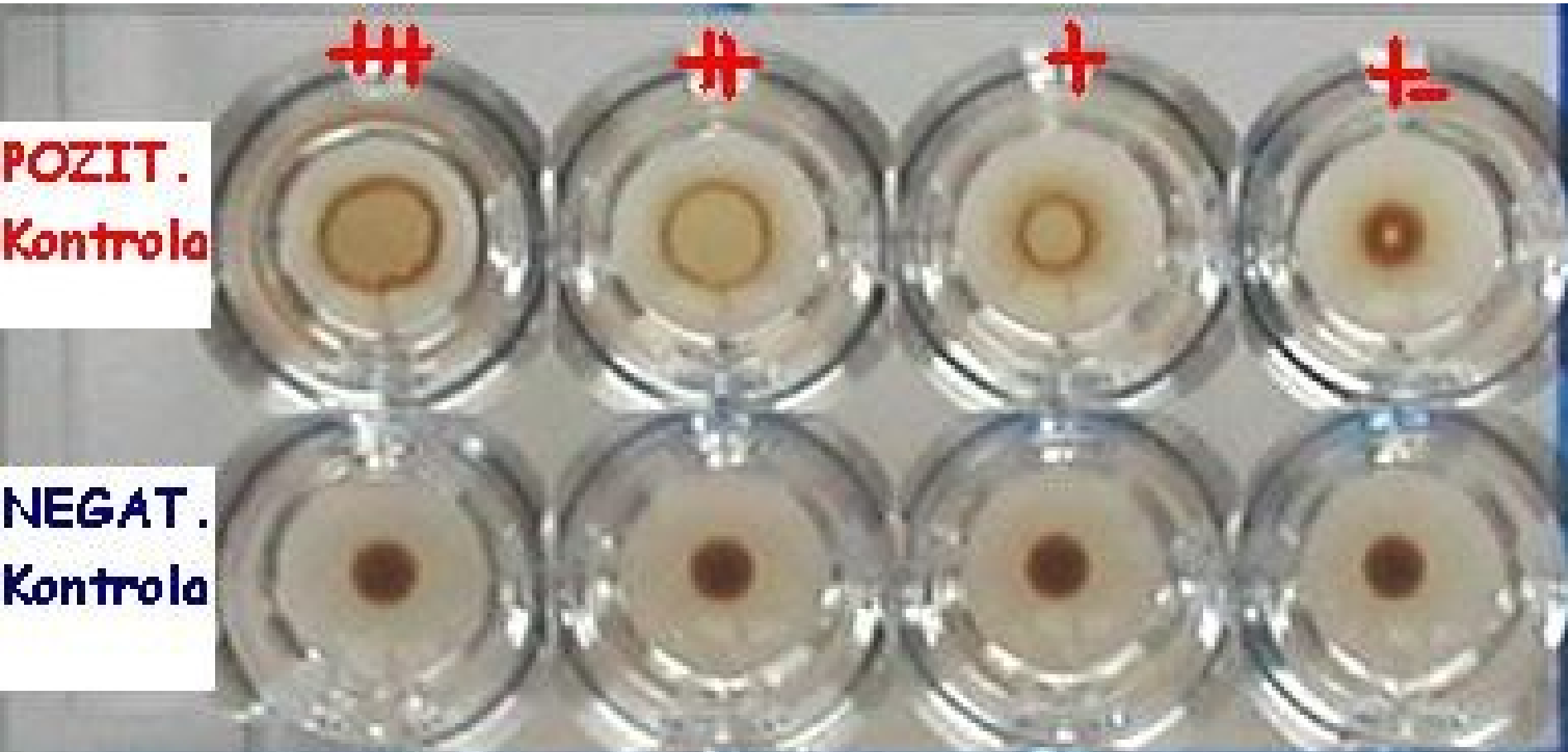


Všimněte si, že máme 1) pozitivní kontroly, 2) negativní kontroly 3) negativní kontroly k jednotlivým důlkům

RRR – hodnocení: zákal = pozitivní,
není zákal = negativní

TPHA – hodnocení:

Mikrobiologický ústav



Indikace ke konfirmaci

- Screeningové reakce se dělají při každém testování na syfilis (včetně např. těhotných, u kterých vůbec nikdo nepředpokládá, že by měly být pozitivní). Screeningové reakce se zpravidla provádějí jen **kvalitativně či semikvantitativně** (i když kvantitativní provedení by nebyl problém)
- Indikací ke konfirmaci je:
 - **jakýkoli pozitivní či alespoň hraniční výsledek** reakce RRR a/nebo TPHA, NEBO
 - přítomnost **suspektních lézí na těle**, nebo **anamnéza** rizikového sexuálního styku – zde i v případě negativity obou reakcí

ELISA, Western blot a PCR v diagnostice spirochet

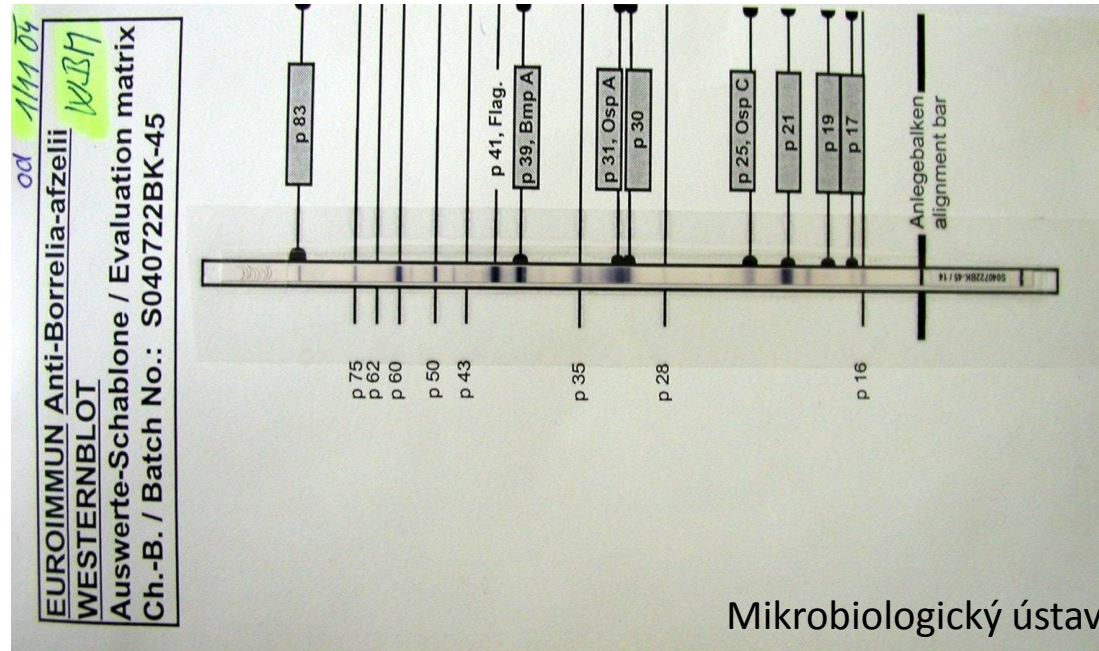
- Jak ELISA, tak i Western blotting a PCR jsou u spirochet používány podobně jako u jiných mikrobů – viz témata J08 a J09 v jarním semestru.
- Pozitivní jsou **pacienti s hodnotami absorbance vyššími než daná hodnota (CAL – kalibrační důlek, cut off a podobně)**
- **Průkaz IgG a IgM je zásadní, pouhá pozitivita IgG znamená jen důkaz prodělané infekce.**
- **PCR se používá v diagnostice syfilis i Lymeské nemoci. Obvykle je pozitivní dříve, než průkazy protilátek**

Borrelie – průběh pátrání

- Především sérologie, popř. PCR.
- Sérologií se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA, pozitivní nálezy se ověřuje Western blotem.
- Western blot je specifitější metodou.
- Při podezření na neuroborreliózu stanovujeme syntézu intrathekálních protilátek
- Přímý průkaz - PCR vyšetřovaným materiálem je zejména likvor

Borrelie – Western blot

- V současné době automatizované systémy
 - hodnocení výsledků prostřednictvím skeneru a vhodného softwaru



Šablona pro odečítání výsledků Western blotu

Leptospiry – průběh pátrání

- V prvních 10 dnech infekce je možný přímý průkaz z krve, moči nebo likvoru
- Později už jen z moči (až 3 měsíce)
 - Mikroskopie v zástinu (viz jarní semestr) málo citlivá
- Kultivace ve speciálním médiu (Korthoffovo), výsledek je nejistý
- Průkaz antigenu v moči s použitím monoklonálních protilátek (dot ELISA)
- Metoda PCR průkaz leptospirové DNA v krvi, moči nebo likvoru

Diagnostika leptospir

- Mikroskopický průkaz leptospir

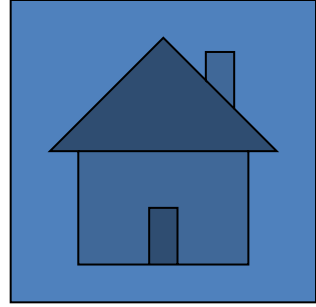


LEPTOSPIRY

Leptospiry – průběh pátrání

- Nepřímý průkaz
 - základ laboratorní diagnostiky
 - týden od začátku infekce lze prokázat protilátky
 - mikroskopický aglutinační test (MAT, MAL)
 - antigen živé kmeny nejčastějších sérotypů leptospir
 - výsledek se hodnotí v zástinu
 - protilátky přítomny – shlukování až lýza leptospir
 - cca. po 14 dnech se odebírá druhý vzorek séra
 - signifikantní je čtyřnásobný vzestup titru protilátek
- MAT lze doplnit průkazem IgM ELISou
- Komerčně dostupné jsou i další testy např. aglutinační

Konec



Rickettsie a chlamydie

Bonusový materiál

Rickettsie a chlamydie *nejsou* acidorezistentní bakterie, s mykobakteriemi mají společnou jen intracelularitu. Třeba vám však tento bonusový materiál poslouží u zkoušky...

Chlamydie

- Povinně **nitrobuněční parazité**.
- Jsou to přesto bakterie, v **mnohém blízké gramnegativním**.
- Od plnohodnotné bakterie se liší především **neschopností vyrobit ATP**, mají ale **buněčnou stěnu**.
- Rod *Chlamydia* poměrně nedávno rozdělen na rody *Chlamydia* a *Chlamydophila*.

Chlamydia trachomatis

- onemocnění závisí na serotypu:
- Serotypy **L1, L2, La2 a L3**
 - vyvolávají tropickou pohlavní nemoc - **lymphogranuloma venereum**.
- Serotypy **D až K**
 - způsobují **pohlavně přenosná onemocnění ve vyspělých zemích**
 - často bez příznaků
 - možné záněty různých částí pohlavního ústrojí
 - možná neplodnost
 - mohou též způsobit záněty spojivky – paratrachom

Chlamydia trachomatis

- Serotypy **A, B, Ba a C**
 - způsobují **trachom** – nejčastější příčinu slepoty v rozvojových zemích
 - postižen téměř každý desátý obyvatel zeměkoule (tj. asi půl miliardy lidí!)
 - začíná jako zánět spojivek
 - slepota přichází během 25–30 let
 - přenos dotykem a nespecifickými přenašeči (mouchy)

Chlamydophila pneumoniae

- především onemocnění dýchacích cest
- od rým a zánětů dutin až po záněty plic

Chlamydophila psittaci

- ptačí nemoc – **ornitóza**
- závažnější papouščí nemoc – **psitakóza**
- důležité je postižení dýchacích cest i jiných orgánů, např. jater
- na chlamydie poměrně odolné, možný přenos i trusem ptáků

Chování chlamydií

- nechají se pohltnout hostitelskou buňkou
- v ní se namnoží
- pak jsou z buňky vypuzeny nebo ji rozloží

Odebírané vzorky u chlamydií

- U nepřímého průkazu samozřejmě sérum
- U přímého průkazu plicních chlamydióz **sputum, případně jiný vhodný materiál** (např. bronchoalveolární laváž)
- U urogenitálních chlamydióz např. **výtěr z cervixu na suchém tamponu** (protože se zpravidla používá průkaz antigenu nebo PCR, ne kultivace)

Diagnostika chlamydií

- Mikroskopie s použitím speciálních barviv je možná, ale běžně se neprovádí
- Gramem se nebarví
- Pro kultivaci nutné speciální odběrové médium
- Kultivace na buněčných kulturách jako u virů. Pozorují se buněčné inkluze
- Významný je **průkaz antigenu**, např. ELISA
- **Nepřímý průkaz: KFR a ELISA**
- **Genetické metody:** genová sonda, PCR, LCR

Léčba

- Tetracykliny, makrolidy

Rickettsie a příbuzné organismy

Základní charakteristika rickettsií

- Podobně jako chlamydie odebírají z hostitelských buněk ATP a navíc i jiné živiny.
- Jsou rovněž **povinně nitrobuněčnými parazity**
- Při výzkumu rickettsií přispěl badatel **Stanislaus Prowazek z Jindřichova Hradce**.
- **Některé druhy, dříve považované za příbuzné rickettsií, se dnes za příbuzné nepovažují,** dokonce nejde o povinně nitrobuněčné parazity. Všechny jsou to ale **drobné, obtížně kultivovatelné bakterie**.

Klinická charakteristika a přenos

- Způsobují různé choroby, často horečnaté (viz dále), často přenášené členovci.

Léčba

- Používají se zpravidla tetracykliny a jejich deriváty. To platí pro naprostou většinu z nich.
- U *Bartonella bacilliformis* se používá spíše penicilin a streptomycin.

Jak je to tedy s tou příbuzností (aneb Taxonomie)

- **Řád Rickettsiales byl rozdělen:**

- Čeleď *Rickettsiaceae* – rody *Rickettsia* a *Orientia*
- Čeleď *Anaplasmataceae* – rody *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*

- **Do řádu Rickettsiales dnes již nepatří:**

- *Coxiella* (samotná čeleď *Coxiellaceae* v řádu Legionellales, tedy k legionelám)
- *Bartonella* (čeleď *Bartonellaceae* v řádu Rhizobiales). Do rodu *Bartonella* patří i bakterie, dříve řazené do rodu *Rochalimea*

Rickettsia

- Jsou to malé kokobacily velké 0,2 až 0,5 μm
- Barví se např. dle Giemsy
- Přenašečem jsou **klíšťata, vši a blechy**
- Onemocnění se vyskytovalo **i u nás, např. za válek**; některé rickettsiózy se i dnes vyskytují v Evropě, většina však spíše v tropech a subtropích, zejména v Africe a Latinské Americe
- Rozlišuje se **skupina skvrnitých horeček** a **skupina skvrnitého tyfu** (tyfových horeček)

Rickettsie skvrnitých horeček

- Přenos **klíšťaty**
- Česky také „**purpurové horečky**“
- Příkladem je **horečka Skalistých hor** (také Rocky Mountains spotted fever, RMSP; jejím původcem je ***Rickettsia rickettsii***), dále Středozemní, Astracháňská či Africká skvrnitá (různé další druhy rickettsií)
- Existuje i ***Rickettsia slovaca***, která způsobuje onemocnění s horečkou příškvary ve vlasaté části hlavy. Vyskytuje se mj. na Slovensku
- ***Rickettsia akari*** způsobuje tzv. **rickettsiové neštovice**

Rickettsie tyfových horeček

- Přenos šatními **vešmi a blechami**
- Projevují se opět **horečkou a vyrážkou**
- Klasický je **skvrnitý tyfus**, způsobený *Rickettsia prowazekii*. Oba badatelé, kteří mu dali jméno, na něj zemřeli
- Po prodělání může mikrob přetrvávat v endoteliálních buňkách a po letech může vzniknout mírnější **Brillova-Zinsserova nemoc**
- Existuje také **endemický tyfus** (též myší tyfus), způsobený *Rickettsia typhi*

Orientia

- Jediným druhem je ***Orientia tsutsugamushi*** (dříve *Rickettsia tsutsugamushi*)
- Způsobuje **křovinný tyfus**, nazývaný též japonská říční horečka či horečka cucugamuši (cucuga = onemocnění, muši = roztoč; přenos roztoči)
- Význam onemocnění vzrostl za II. světové války a za války ve Vietnamu
- Vyskytuje se hlavně **ve východní a jihovýchodní Asii**

Stanislaus Prowazek (1875–1915)

- "Nikdo nemůže vyjádřit mínění o povaze viru jen na základě experimentů, tak, jak se v nynější době stává se dogmatem."
- Mikrobiolog a zoolog a objevitel původce skvrnitého tyfu **Stanislaus Prowazek** se narodil v Jindřichově Hradci v rodině důstojníka rakouské armády dne 12. listopadu 1875. Studoval na přírodovědecké fakultě v Praze a ve Vídni. Jeho doktorská práce zaujala Paula Ehrlicha (pozdějšího držitele Nobelovy ceny). A tak se Prowazek stal jeho asistentem. Postupně se stává nadějí německé medicínské parazitologie. Prowazek se stává vedoucím protozoologické laboratoře Institutu pro tropické choroby v Hamburgu. Další osudy této erudované osobnosti jsou spojeny se skvrnitým tyfem, typickou válečnou chorobou. Za tou se Prowazek v roce 1913 vypravuje do Srbska. Prowazek v chotěbuzském zajateckém lágru studoval nad mikroskopem tyfový materiál nemocných zajatců. Toto studium se mu stalo osudným. Podobně jako Ricketts i on se nakazil skvrnitým tyfem a dne 17. února 1915 zemřel.
- 99 www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif

Anaplasma phagocytophilum

- Často je z praktických důvodů původce řazen mezi ehrlichie. Vyskytuje se v Evropě i USA.
- Způsobuje nemoc zvanou **HGE (human granulocytar ehrlichiosis)**.
- Příznaky jsou **horečka, bolesti hlavy a svalů**.
- Onemocnění přenášejí klíšťata, někdy se hovoří o **klíšťové ehrlichioze**, po borelióze a klíšťové encefalitidě je to třetí nejvýznamnější klíšťové onemocnění u nás.

Ehrlichie (ostatní)

- *Ehrlichia chafeensis* se vyskytuje převážně v USA. Způsobuje nemoc zvanou **HME** (human monocytar ehrlichiosis); nevolnost, horečka, bolest hlavy a další.
- *Ehrlichia ewingii* se také vyskytuje v USA. způsobuje tzv. **Ewingovu ehrlichiózu** (bolest hlavy, horečka, hlavně oslabení pacienti).
- Příbuzná *Neorickettsia sennetsu* se vyskytuje ve východní Asii a způsobuje horečku sennetsu. Na rozdíl od ostatních ji nepřenášejí klíšťata, člověk se nakazí pozřením syrových ryb (japonské suši).

Coxiella burnetii

- Je to drobná G- tyčinka ($1 \times 0,3 \mu\text{m}$), ale barví se spíše dle Giemsy či Giménezze.
- Způsobuje takzvanou **Q-horečku**, poprvé popsanou 1937 v Austrálii.
- Jde o **akutní horečnaté onemocnění** s atypickou pneumonií nebo chronickou infekci s endokarditidou. Může postihnout i játra či mozkové blány.
- Vyskytuje se **ve všech světadílech**. Zdrojem jsou hlodavci, přenašečem klíšťata.

Bartonella

- Jsou to **G- tyčinky**, barví se však lépe Giemsou. Jsou jen fakultativně intracelulární.
- Jsou dokonce schopny růst na krevním nebo čokoládovém agaru, musí ale mít 10 % CO₂ a **vyrostou až za 5 až 42 dní**. Proto je i u nich podobná diagnostika jako u ostatních.
- Mohou **přežívat v erythrocytech**, což je chrání před imunitní odpovědí i antibiotiky.

Jednotlivé druhy 1

- ***Bartonella quintana*** (dříve *Rochalimea*) je původcem volyňské či zákopové horečky, známé z I. světové války. Dnes může být problémem u bezdomovců, narkomanů či alkoholiků. Jde o horečku s bolestmi.
- ***Bartonella hensellae*** způsobuje tzv. bacilární angiomatózu (porušení kůže a vnitřních orgánů) a některé případy nemoci z kočičího škrábnutí (další má na svědomí *Afipia felis*).

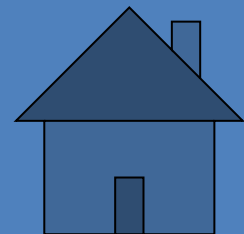
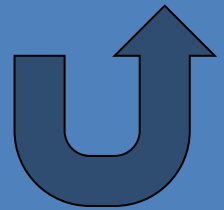
Jednotlivé druhy 2

- ***Bartonella bacilliformis*** je původcem **horečky Oroya**. Smrtnost horečky Oroya je až 40 %. Vyskytuje se hlavně v Jižní Americe.
- Při horečce, ale i v případě, kdy horečka není přítomna, je také možný výskyt tzv. **peruánských bradavic** (*verruca peruviana*).
- Jeden peruánský student medicíny chtěl dokázat, že peruánské bradavice způsobuje mikrob. Naočkoval se materiálem z bradavice a zemřel na horečku Oroya. Ta se po něm jmenuje také **Carrionova choroba**.

Diagnostika rickettsií a dalších druhů

- se provádí **jen ve vyčleněných laboratořích** za zvlášť přísných bezpečnostních opatření
- Mikroskopie se zpravidla neprovádí
- **Kultivace na žloutkovém vaku nebo buněčných kulturách**
- **Antigenní analýza imunofluorescencí**
- **PCR**
- **Nepřímý průkaz** KFR, aglutinací a imunofluorescencí
- U některých rickettsií funguje zkřížená aglutinace – protilátky reagují s O antigeny některých nepohyblivých kmenů Protea (tzv. Weil-Felixova reakce)

Konec bonusového materiálu



BONUS: Rozšířené povídání o mikroskopii bakterií

- Bakterie jsou **dobře viditelné v elektronovém mikroskopu**, v praxi se nevyužívá
- **V optickém mikroskopu jsou viditelné mizerně**. Lépe je vidíme, pokud se pohybují
- Nemůžeme však spoléhat na pohyblivost bakterií. Zviditelníme je proto jinak: **fixujeme je a obarvíme některou z barvicích metod**
- **Světlolomné bakterie**, zejména spirochety, s výhodou pozorujeme pomocí **zástinové mikroskopie**

Příprava preparátu

- Pro zdárné mikroskopování je nutno připravit **kvalitní preparát**.
- Preparát je nutno připravit tak, aby byly bakterie i ostatní objekty **dobře viditelné**. Nátěr nesmí být příliš řídký, příliš hustý, při fixaci se nesmí spálit (ale ani nedostatečně fixovat) aj. U **nativního preparátu** včetně zástinové mikroskopie je třeba zachovat mikroorganismy **životaschopné**.
- Špatně připravený nátěr obsahuje různé artefakty (krystaly barviva, nečistoty...) – ty se mohou vyskytnout ovšem i v nátěru připraveném správně

Části mikroskopu – dopadající světlo

- **Světlo** prochází ze zdroje světla přes kolektor a kondenzor. Kvalitu a množství paprsků ovlivňuje
 - intenzita napětí zdroje světla
 - irisová clona kolektoru (v dolní části mikroskopu)
 - nastavení výšky kondenzoru
 - nastavení clony kondenzoru (apertura)
- **Výška kondenzoru** se obvykle nastaví při zaclonění. V jednom okamžiku okraj clony přestane být modrý a začne být červený – to je ten správný moment. Pak se clona zase rozevře.
- Je také třeba dbát na správné **centrování obrazu**. Při centrování se používají dva drobné šroubky, které jsou z boku na kondenzoru ve vzájemném úhlu 90°

Kondenzor u normální a zástinové mikroskopie

- U **normálního mikroskopu** je cílem kondenzoru pouze soustředit paprsky tak, aby ideálním způsobem a v ideálním množství dopadaly na preparát
- U **zástinové mikroskopie** je kondenzor uzpůsoben speciálně tak, aby **paprsky dopadaly zešikma**. Paprsky, které by byly rovnoběžné s optickou osou, jsou přitom **zastíněny clonou**.

Zvětšovací optika

- V mikrobiologii používáme zpravidla binokulární mikroskop s vyjímatelnými **okuláry** zvětšujícími 10×
- **Objektivy** se používají 4×, 10×, 20×, 40×, 60× a imerzní objektiv zvětšující 100×. „Imerzní“ znamená, že mezi preparát a objektiv se kápne imerzní olej, jehož index lomu je bližší indexu lomu skla, než v případě vzduchu
- Každý objektiv je u novějších mikroskopů opatřen nejen číslem zvětšení, ale také číslem, které informuje, na jakou hodnotu má být při jeho použití upravena **clona kondenzoru**

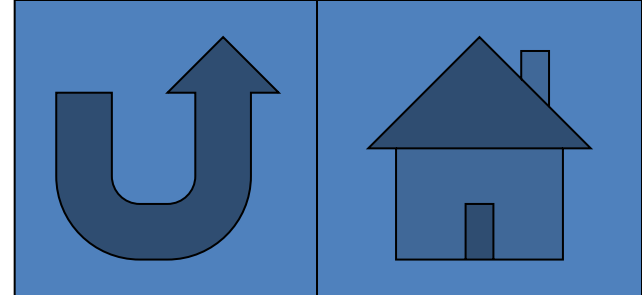
Zaostřování a vlastní mikroskopie

- Aniž bychom se dívali do okuláru, **přiblížíme** makrošroubem preparát k objektivu na co nejtěsnější vzdálenost
- Nyní, již pod kontrolou zraku preparát **opatrně oddalujeme**, nejdříve makrošroubem, pak i mikrošroubem, až se dostaneme na příslušnou hladinu ostrosti
- V některých případech (hlavně u nativních preparátů) není jedna hladina ostrosti, ale je nutno stále **přeostřovat** na „dno“ a „hladinu“ prostoru vyplněného tekutinou. To je obtížnější, než mikroskopovat jednu rovinu (u fixovaných a barvených preparátů)

Speciální mikroskopické techniky

- **Mikroskopie v zástinu** – používá se u světlolomných objektů (např. spirochet). Na objekt dopadají paprsky zešikma a do oka dopadnou POUZE ty, které se na něm zlomí
 - Anglicky se jí říká „darkfield microscopy“ – mikroskopie v temném poli. Pozadí je tmavé, bakterie světlá
- **Mikroskopie ve fázovém kontrastu** využívá fázový posun paprsku
- **Fluorescenční mikroskopie** jako taková by se neměla zaměřovat s imunofluorescencí (u klasické fluorescenční mikroskopie nejde vůbec o reakci antigenu s protilátkou)

Čištění mikroskopu



- Po každém použití imerzního oleje je nutno očistit **objektiv gázou s alkoholéterem** (méně vhodný, leč použitelný, je benzín)
- Občas je nutno očistit **i neimerzní objektivy**, zejména pokud jsou potřísněny např. olejem
- Při potřísnění je také nutno otřít **mikroskopický stolek**, zde stačí čtvereček buničité vaty s benzínem. Nečistota často ulpívá pod zařízením pro uchycení sklíčka, proto je někdy nutno tuto část odmontovat a vyčistit.